

# **BTLA Effector Reporter Cell**

## **CBP74118**

### **操作说明书**



4008-750-250

## 目录

1. 背景信息 .....	1
2. 产品介绍 .....	1
3. 细胞基本信息 .....	3
4. 主要仪器试剂耗材 .....	4
5. 细胞培养 .....	4
5.1 细胞复苏 .....	4
5.2 细胞传代 .....	5
5.3 细胞冻存 .....	5
6. 细胞实验流程 .....	5
6.1 BTLA/HVEM Blockade Assay .....	5
6.2 BTLA Agonist Assay .....	5
7. 数据展示 .....	8
8. 相关产品 .....	7

## 1. 背景信息

BTLA 是一种含有免疫球蛋白结构域的糖蛋白，表达于 T 细胞、休眠性 B 细胞、巨噬细胞、树突状细胞和少部分 NK 细胞上。BTLA 作为 T 细胞的抑制受体，抗 BTLA 治疗可导致 T 细胞增殖，BTLA 基因敲除小鼠表现出高反应性免疫激活。HVEM 是一种肿瘤坏死因子受体，在小鼠和人类中被鉴定为 BTLA 的天然配体。抗原呈递细胞（APCs）表达 HVEM 可诱导 BTLA 依赖性 T 细胞抑制。

## 2. 产品介绍

科佰生物推出 BTLA Effector Reporter Cell 报告基因细胞，在由调控因子并表达报告基因的重组细胞上，稳定表达人 BTLA。见图 1 流式验证 BTLA 表达。

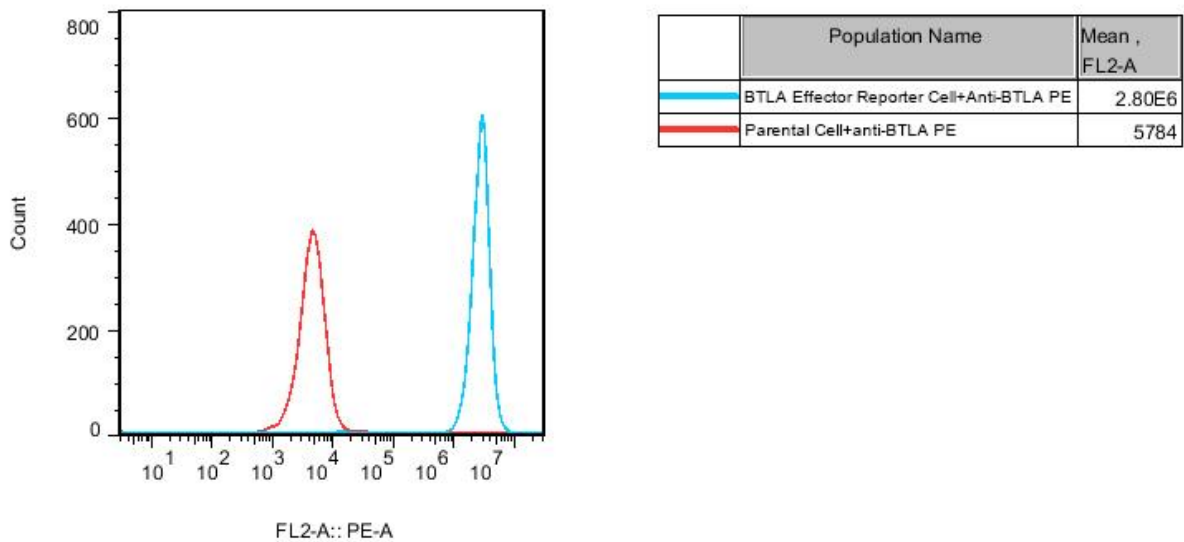


图 1: BTLA Effector Reporter Cell 细胞稳定表达人 BTLA

报告基因细胞模型可以很好的反映分子作用机制，同时具备更小的变异性和更好的可操作性，已被中检院及药企广泛应用于抗体药物生物活性的检定，对于药物研发、质量控制、批次放行都有重要意义。

BTLA/HVEM 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 BTLA/HVEM 的信号转导过程，原理见图 2 图 3 所示。

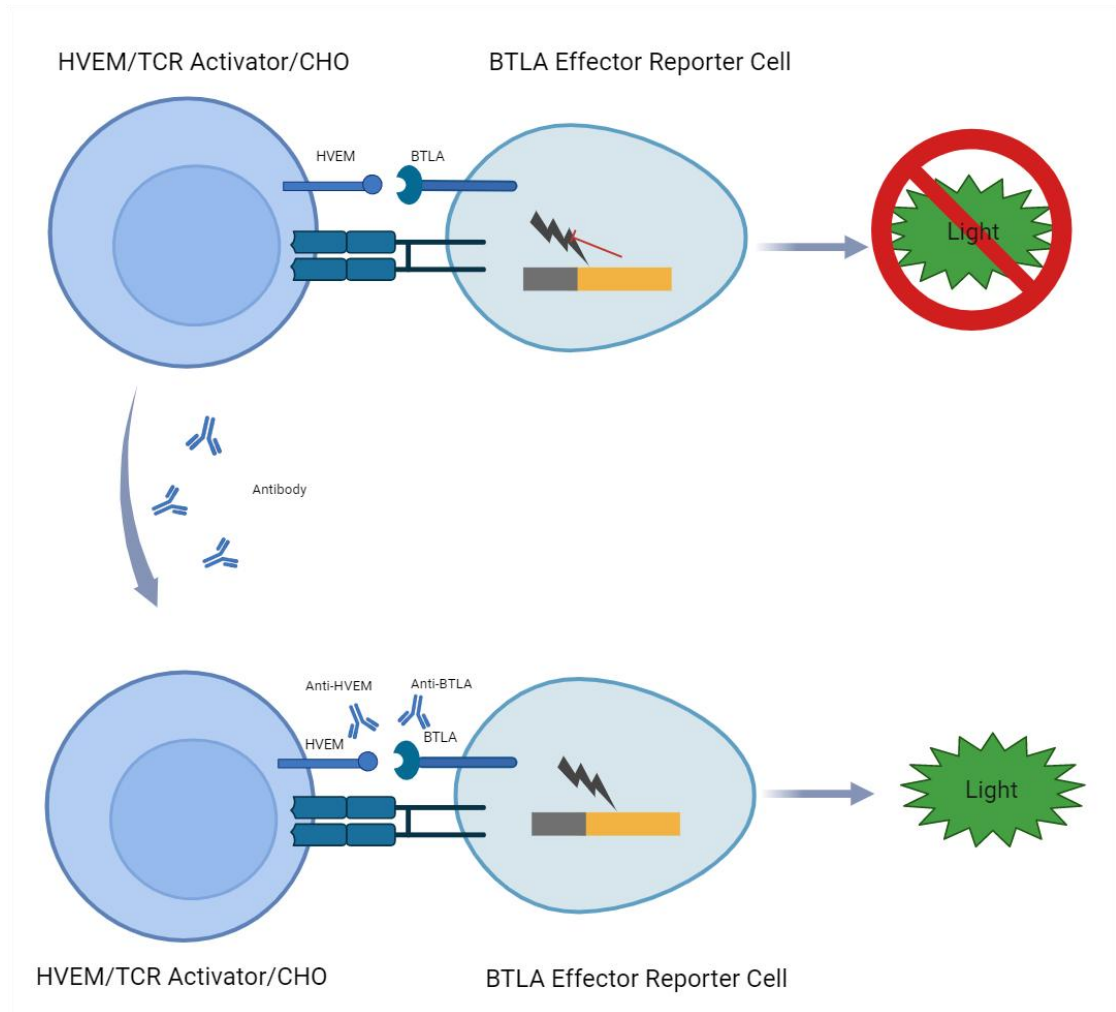


图 2: BTLA/HVEM 细胞模型原理图

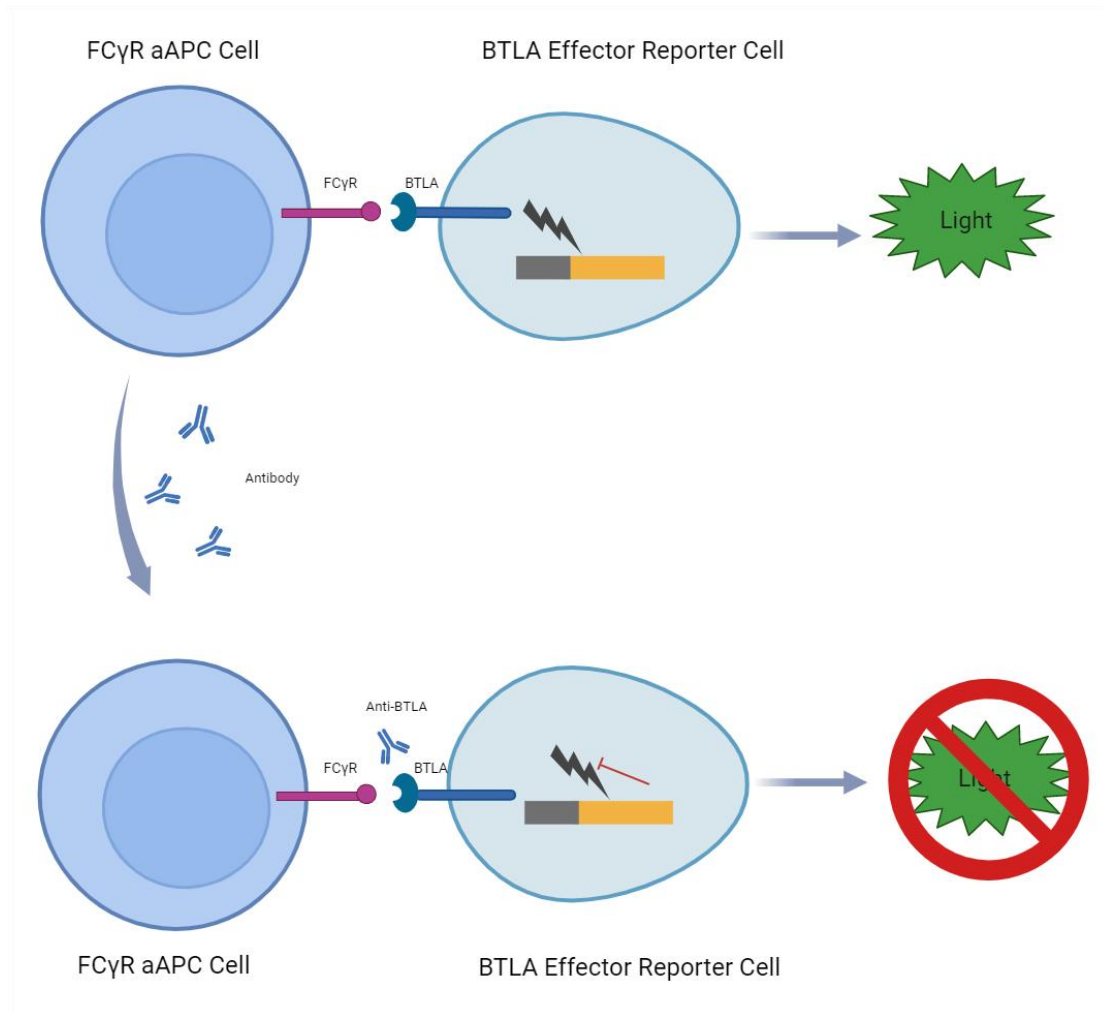


图 3: BTLA/HVEM 细胞模型原理图

### 3. 细胞基本信息

表达基因: BTLA

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS+1ug/ml puromycin+800ug/ml hygromycin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

细胞形态: 悬浮

支原体检测: 阴性

稳定性: 32 代 (室内测试结果, 不表示超过 32 代以上不稳定)

保存条件: 液氮保存

应用: 细胞水平 BTLA 信号传导的激活剂或抑制剂的活性检测, 可用于高通量筛选或 QC 放行

## 4. 主要仪器试剂耗材

名称	品牌	货号
BTLA Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74118M
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
HVEM/TCR Activator/CHO 细胞	Cobioer	CBP74082
FCyR aAPC Cell 细胞	Cobioer	CBP74185
Anti-BTLA mAb	Cobioer	CBP74118A
Anti-HVEM mAb	Cobioer	CBP74013A
22B7	/	/
6G3	/	/
Icatolimab	/	/
Isotype Human IgG4	/	/
Ultra Luciferase Detection Kit	Cobioer	CBPH0001
96 Well Assay Plate (White Plate, Clear Bottom with Lid Tissue Culture Treated Polystyrene 1/Pack)	Costar	3610
Synergy H1 多功能酶标仪	Biotek	/

## 5. 细胞培养

### 5.1 细胞复苏

- 1) 在 37°C 水浴中快速融化细胞约 60 秒。一旦细胞解冻（可能比 60 秒稍快或稍慢），快速将冻存管中的细胞吸入装有 10 ml 预热 BTLA Effector Reporter Cell 完全培养基的 15 ml 离心管中。
- 2) 1000 转、5 分钟离心细胞，除去培养基并将细胞重悬于 5 ml 预热的完全培养基中。
- 3) 调整细胞密度到  $3-6 \times 10^5$  cells/ml，加入 T25 培养瓶中，放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。

## 5.2 细胞传代

每 1-2 天取细胞悬液计数，当密度大于  $1 \times 10^6$  cells/ml 时,请及时传代或补加新鲜完全培养基. 保持细胞密度在  $1 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  cells/ml 之间。

## 5.3 细胞冻存

取  $4-8 \times 10^6$  细胞离心后弃上清。加 1ml 细胞冻存液(90% FBS+10%DMSO)，吹打均匀，加入细胞冻存管。立即放入细胞冻存盒（Nalgene 5100-0001），加异丙醇到刻度线，放  $-80^\circ\text{C}$  冰箱。24 小时后将冻存管转到液氮中长期保存。

## 6. 细胞实验流程

### 6.1 BTLA/HVEM Blockade Assay

BTLA/HVEM Blockade Assay 由报告细胞 BTLA Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74118 细胞和靶细胞 HVEM/TCR Activator/CHO, Cat. #CBP74082 细胞配对开展，本实验中使用 Anti-BTLA mAb, Cat.#CBP74118A 和 Anti-HVEM mAb, Cat.#CBP74013A 作为测试样本，对本模型的生物功能进行验证。

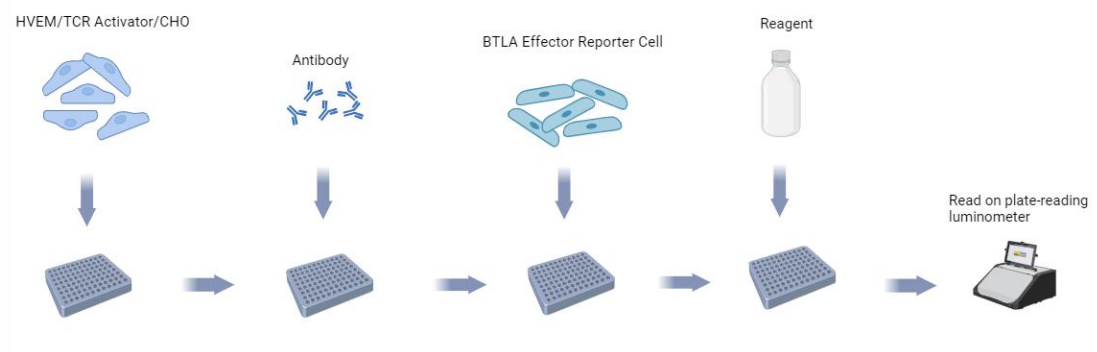


图 3: BTLA/HVEM Blockade Assay 流程示意图

- 1) 取对数生长的 HVEM/TCR Activator/CHO 细胞，胰酶消化重悬于新鲜的含 10%FBS 的 F12K 培养基中，将重悬的细胞密度调整为  $4 \times 10^5$  cells/ml。
- 2) 将重悬的细胞接种到白壁透明底的 96 孔细胞培养板中，100 ul/孔细胞悬液， $37^\circ\text{C}$  培养箱培养过夜。
- 3) 第二天将接种 HVEM/TCR Activator/CHO 细胞的 96 孔板内 F12K 培养基吸干，另用 10%

血清 RPMI1640 培养基对测试样本进行梯度稀释，加入梯度稀释的 2\*浓度样品（50 ul/孔）到接种好细胞的 96 孔板中，样本从最高浓度 100 ug/ml（2\*浓度）开始，5 倍稀释 11 个浓度梯度，并另外设置空白培养基对照孔。（注意：样品浓度及梯度设置跟样品本身的特性及客户的实验需求高度相关，客户应根据自身的实际情况优化设置，我们不作具体推荐，本梯度稀释方案仅适用我们本次验证实验涉及样本）

- 4) 取对数期生长的 BTLA Effector Reporter Cell 细胞离心弃上清，重悬于新鲜的 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中将重悬的细胞密度调整为  $4 \times 10^5$  cells/ml，然后将细胞加入步骤 3 的 96 孔板中，每孔 50 ul，放置 37°C 培养箱中继续培养 5.5 到 6 小时。
- 5) 将 96 孔板从培养箱中取出，加入 100 ul/孔 Ultra Luciferase Detection Kit, Cat.#CBPH0001 放置 3 到 5 分钟，放入酶标仪中读取数值。
- 6) 根据每个梯度浓度孔对应的读值，利用 Prism Graphpad 软件拟合样品对细胞激活的梯度曲线，并且计算样品的 EC50。

孔板排布：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Assay Buffer
B	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	参考样本
C	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本1
D	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本2
E	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	参考样本
F	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本1
G	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本2
H	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Assay Buffer

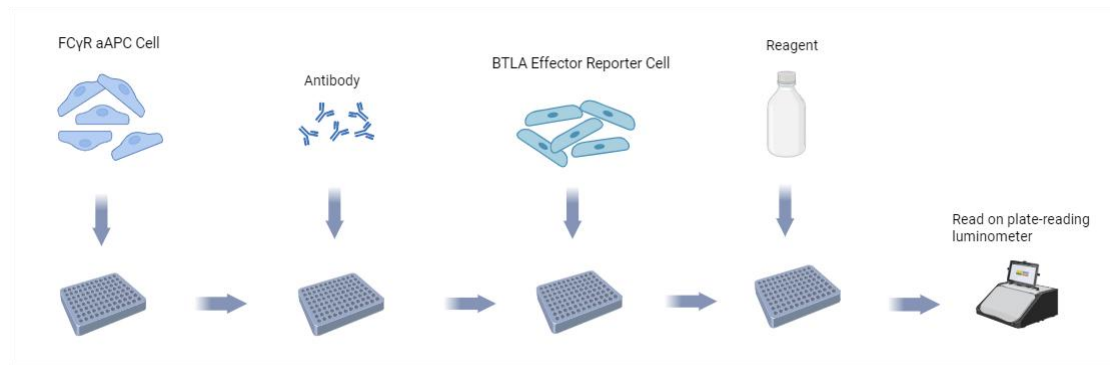
图 4: 96 孔板排布建议案例展示

## 6.2 BTLA Agonist Assay

BTLA Agonist Assay 由报告细胞 BTLA Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74118 细胞和靶细胞 FCyR aAPC Cell, Cat. #CBP74185 细胞配对开展，本实验中使用 22B7,6G3,Icatolimab, Isotype



Human IgG4 作为测试样本，对本模型的生物功能进行验证。



- 1) 取对数生长的 FCyR aAPC 细胞，胰酶消化重悬于新鲜的含 10%FBS 的 F12K 培养基中，将重悬的细胞密度调整为  $4 \times 10^5$  cells/ml。
- 2) 将重悬的细胞接种到白壁透明底的 96 孔细胞培养板中，100 ul/孔细胞悬液，37°C 培养箱培养过夜。
- 3) 第二天将接种 FCyR aAPC 细胞的 96 孔板内 F12K 培养基吸干，另用 10%血清 RPMI1640 培养基对测试样本进行梯度稀释，加入梯度稀释的 2\*浓度样品（50 ul/孔）到接种好细胞的 96 孔板中，样本从最高浓度 2 ug/ml（2\*浓度）开始，3 倍稀释 11 个浓度梯度，并另外设置空白培养基对照孔。（注意：样品浓度及梯度设置跟样品本身的特性及客户的实验需求高度相关，客户应根据自身的实际情况优化设置，我们不做具体推荐，本梯度稀释方案仅适用我们本次验证实验涉及样本）
- 4) 取对数期生长的 BTLA Effector Reporter Cell 细胞离心弃上清，重悬于新鲜的 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中将重悬的细胞密度调整为  $8 \times 10^5$  cells/ml，然后将细胞加入步骤 3 的 96 孔板中，每孔 50 ul，放置 37°C 培养箱中继续培养 5.5 到 6 小时。
- 5) 将 96 孔板从培养箱中取出，加入 100 ul/孔 Ultra Luciferase Detection Kit, Cat.#CBPH0001 放置 3 到 5 分钟，放入酶标仪中读取数值。
- 6) 根据每个梯度浓度孔对应的读值，利用 Prism Graphpad 软件拟合样品对细胞激活的梯度曲线，并且计算样品的 EC50。

## 7. 数据展示

Dose Response of BTLA Blocking Antibody in BTLA Effector Reporter Cells (Clone 1)  
With HVEM / TCR Activator - CHO Cells

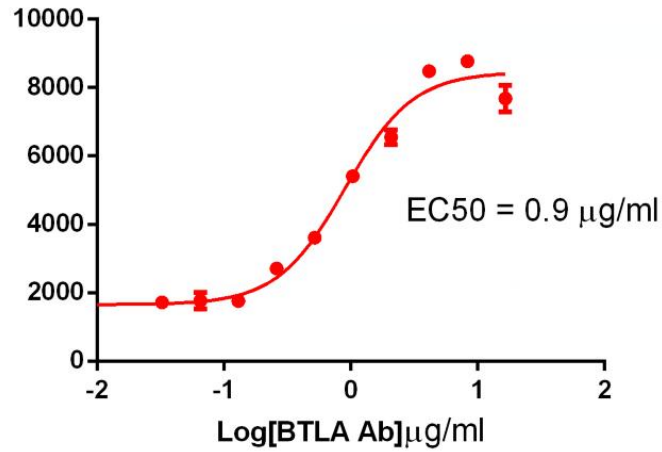


图 5: BTLA/HVEM Blockade Assay 验证结果 (测试样本: Anti-BTLA Ab)

Dose Response of HVEM Blocking Antibody in BTLA Effector Reporter Cells (Clone 1)  
With HVEM / TCR Activator - CHO Cells

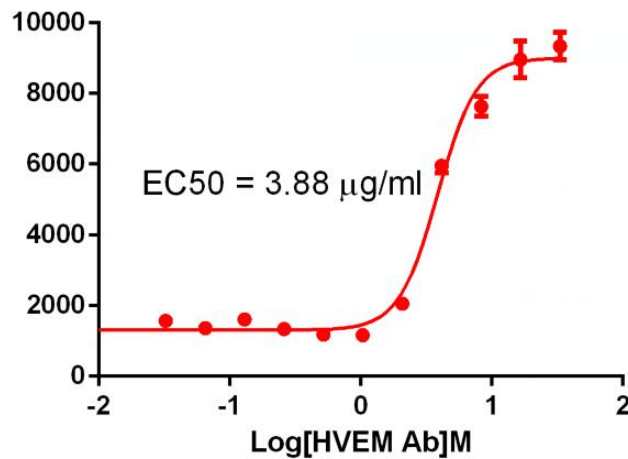


图 6: BTLA/HVEM Blockade Assay 验证结果 (测试样本: Anti-HVEM Ab)

Dose Response of BTLA Agonist Abs in BTLA Effector Reporter Cells With FC $\gamma$ R aAPC Cells

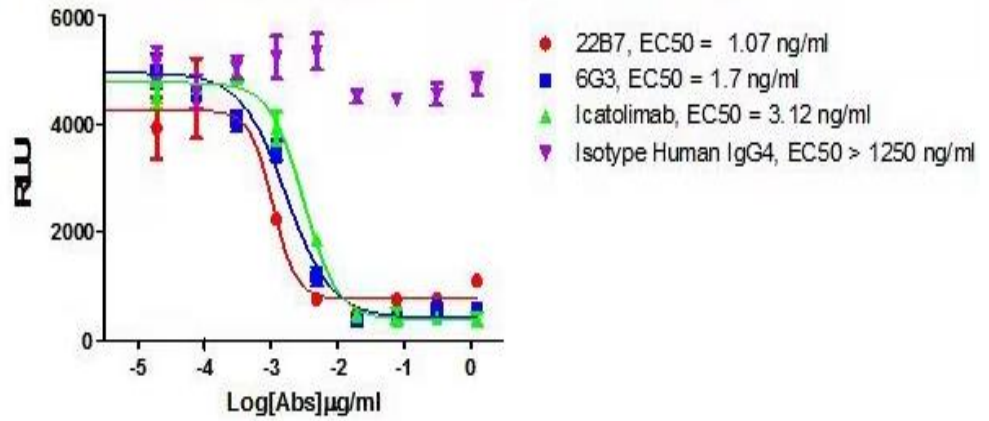


图 7: BTLA Agonist Assay 验证结果

## 8. 相关产品

名称	货号
BTLA Effector Reporter Cell	CBP74118
BTLA/SHP2 Reporter Cell	CBP74177
HVEM/U2OS Cell	CBP74178
HVEM/TCR Activator/CHO	CBP74082
HVEM/NF $\kappa$ B-Luc/Jurkat	CBP74013
HVEM/HEK293	CBP74047
HVEM/CHO	CBP74037
FC $\gamma$ R aAPC Cell	CBP74185